BIOLOGISCHE EFFEKTE VON LIPOSOMEN GUANIDINHALTIGER VERBINDUNGEN IM KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfram Sarrazin
aus Hannover

1978

78 391

BIOLOGISCHE EFFEKTE VON LIPOSOMEN GUANIDINHALTIGER VERBINDUNGEN IM KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfram Sarrazin
aus Hannover

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	28.6.1978
Dekan	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter	Prof. Dr. U. Weber

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden von November 1975 bis Januar 1978 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel für die Überlassung des Themas, die effektive Beratung bei der Durchführung der Versuche und für die großzügige Förderung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung und Fragestellung 1

II. Experimenteller Teil 5

A. Materialien 5

B. Methoden 10

1. Darstellung der Liposomen 10

1.1 Allgemeine methodische Betrachtung 10

1.2 Herstellung der Liposomen nach der hand shaken Methode 17

1.3 Herstellung der Liposomen nach der Injektionsmethode 19

1.4 Quantitative Bestimmung der verkapselten Substanz 19

2. In vivo Messung des [U-^{14}C] -Glucose-Einbaus am Diaphragma und am Nebenhoden-fettkörper der Maus 22

3. Messung der [1-^{14}C] -Glucose-Oxidation an isolierten Fettzellen des Nebenhoden-fettkörpers der Ratte 26

4. Messung der [U-^{14}C] -Glucoseaufnahme am isolierten Hemidiaphragma der Ratte 27

III. Ergebnisse 30

A. Ergebnisse der Verkapselungen 30

1. nach der hand shaken Methode 30

2. nach der Injektionsmethode 33

B. Wirkung von Arginindiäthylamid auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus 35

C. Wirkung von Agmatin auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus 42

D. Wirkung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus 45

E. Blutzuckerbestimmungen 49

F. In vitro Verhalten von Liposomen und Phosphatidylinositol-Vesikeln 55

1. Wirkung auf die [1-^{14}C]-Glucose-Oxidation an isolierten Fettzellen der Ratte 55

2. Wirkung auf die [U-^{14}C]-Glucose-Aufnahme am isolierten Hemidiaphragma der Ratte 57

IV. Diskussion 60

V. Zusammenfassung 70

VI. Literatur 72

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Untersuchungen an halbsynthetischen Insulinen, bestehend aus natürlicher A-Kette und sequenzvariierter synthetischer B-Kette, führten zu dem Ergebnis, daß der Arginylrest B 22, wie auch die aromatischen Aminosäuren B 24-26, an der Insulinwirkung beteiligt sind [1-7]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß dieser Sequenzbereich, Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2, schon für sich alleine Insulinaktivität am isolierten Diaphragma und an isolierten Fettzellen der Ratte entfalten kann [8-10].

Darüber hinaus wurde gefunden, daß bestimmte Arginylverbindungen in vitro insulinähnliche Aktivitäten aufweisen können [11-13]. Als Testsysteme dienten hier ebenfalls das Rattenzwerchfell, isolierte Fettzellen sowie der Nebenhodenfettkörper der Ratte.

In weiteren Arbeiten wurden diese beiden Substanzgruppen auf insulinähnliche Wirkungen in vivo untersucht [14]. Hierbei zeigte sich, daß eine Gruppe in vitro hoch aktiver Arginylverbindungen, insbesondere das Arginindiäthylamid, in vivo unwirksam waren. Andererseits erreichten andere Verbindungen wie das Oligopeptid Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 im Zwerchfell 100% der durch Insulin maximal zu erhaltenen Werte, doch blieb dieser Effekt auch bei sehr hohen Konzentrationen auf den intraperitonealen Raum beschränkt. Agmatin, das in vitro der Insulinwirkung folgt, zeigte in

vivo nur noch in den Fettgeweben eine schwache Wirkung. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die hier untersuchten Verbindungen entweder im intraperitonealen Raum oder aber im Blut oder der Leber inaktiviert und eliminiert werden, so daß keine Wirkung auf das periphere Muskel- oder Fettgewebe ausgeübt werden kann.

Eine Möglichkeit, den drei genannten Verbindungen auch in vivo eine biologische Aktivität zu verleihen, besteht nun darin, Liposomen als carrier in den entsprechenden Testsystemen einzusetzen.

Von dieser Methode, verkapselte Systeme zu benutzen, die aus einer Lipokapsel und Inhaltstoff bestehen, ist in letzter Zeit zunehmend Gebrauch gemacht worden. Man macht sich hierbei folgende Tatsache zunutze: Werden Phospholipide im Überschuß einer wässrigen Lösung suspendiert, so bilden sich spontan Vesikel, die aus multilamellaren, konzentrischen Doppelschichten bestehen. Anfangs dienten solche Vesikel, fortan als Liposomen bezeichnet, als Modellsysteme für Untersuchungen von Permeabilitätseigenschaften der Lipiddoppelschicht, da Liposomen bestimmter Phospholipid-Cholesterin Zusammensetzungen in ihren Permeabilitätseigenschaften in etwa denen natürlicher Membranen entsprechen [15].

In jüngerer Zeit werden Liposomen erfolgreich als carrier eingesetzt [16]. Man geht dabei von dem Gedanken aus, daß die innerhalb des Liposoms in wässrigem Medium gelöste Substanz weitgehend gegen Inaktivierung von außen geschützt ist, Somit kann sich ihre volle Wirkung am Zielorgan, in der Zelle oder an der Zellmembran, nach Auflösung des Liposoms entfalten.

Es erschließt sich hier ein großes Anwendungsgebiet Liposomen therapeutisch einzusetzen [17]. Gleichzeitig aber ergibt sich eine vielschichtige, zum überwiegenden Teil noch ungelöste Problematik, weil die Kapsel 1. mit seiner Außensphäre mit Bestandteilen des Blutes oder Membranen der Gewebe reagiert [41] und 2. mit der Innensphäre Wechselwirkungen mit den Inhaltstoffen entwickelt.

Die der Arbeit zugrunde liegende Problemstellung umfaßt in den Hauptpunkten die Verkapselung der drei niedermolekularen Verbindungen Agmatin, Argininidiäthylamid sowie Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2. Dabei sollten mehrere in der Literatur [18] beschriebene Herstellungsverfahren überprüft und eine für die vorliegende Problematik leistungsfähige Methode ermittelt werden. Weiterhin sollten die als Liposomen verkapselten Substanzen in vivo insulinsensitiven Testen unterzogen

werden. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob die in vivo inaktiven Verbindungen Agmatin und Argininäthylamid in verkapselter Form eine in vivo Aktivität zeigen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 in verkapselter Form eine höhere biologische Aktivität erreicht.

Von großem Interesse war es auch zu erfahren, ob sich die lokalen insulinähnlichen Aktivitäten der drei Verbindungen auch auf den Gesamtorganismus auswirken, wenn sie verkapselt sind.

Schließlich war es Aufgabe der Arbeit, mögliche Stoffwechselwirkungen der verwendeten Lipide selbst in den untersuchten Systemen festzustellen.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Materialien

Ausgangssubstanzen

Agmatinsulfat	Aldrich Chem.Comp.Inc. Milwaukee
Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2	wurde teilweise freundlicherweise von Herrn Priv.Doz. Dr.K.Eisele, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt, teilweise vom Autor selbst wie beschrieben [19] synthetisiert.
Dicetylphosphat	Sigma Chemical Company St.Louis
Phosphatidylinositol crude from Soybean	"
L-α-Phosphatidylinositol	"
DL-α-Phosphatidylcholin-dipalmitoyl	"
Lecithin aus Eiern	E.Merck Darmstadt
Cholesterin für biochem. Zwecke	"
Stearylamin	Fluka A.G. Buchs
Rinderinsulin 27 IU/mg ca. 0,3% Zinkgehalt	Farbwerke Hoechst
Humanalbumin	Schweizer Rotes Kreuz Bern

Collagenase	Worthington, Freehold U.S.A.
L-Aminosäuren	Firmen E.Merck Darmstadt und Serva Heidelberg
[1-^{14}C] - Glucose und [U-^{14}C] - Glucose	Amersham, England

Kieselgel rein für die Säulenchromatographie
Korngröße 50 - 100 µ Serva Heidelberg
Platten für die Dünnschichtchromatographie
DC-Platten,CEF
DC-Platten SI und SIF
(Kieselgel) Riedel-De Haen, Seelze

Alle anderen hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck A.G. Darmstadt bezogen, die Lösungsmittel zur Liposomenherstellung wurden ebenfalls von E.Merck bezogen und waren analysenrein.

Darstellung von Arginindiäthylamid [11]

$N^{\alpha}.N^{G}.N^{G}.-Z_3$-L-Arginin

Die Synthese dieses N- substituierten Arginins erfolgte wie schon beschrieben [19] über das N^{α}-Z-L-Arginin und über das Z_3-L-Arg-Natriumsalz nach den Vorschriften von Boisonnas [20] und nach Wünsch, Wendelberger [21].

$N^{\alpha}.N^{G}.N^{G}.-Z_3$-L-Arginin-N.N-diäthylamid

Ansatz : 6,5 g Z_3-L-Arg (22,6 mM)

Es wurde nach folgender Methode gearbeitet [22, 11]:
6,5 g Z_3-L-Arginin werden in 50 ml abs. Chloroform gelöst und mit 1,55 ml Triäthylamin versetzt. Nach Zugabe von 50 ml abs. Toluol kühlt man die Lösung auf -3 bis -5 °C ab, gibt 1,45 ml Chlorameisensäure-isobutylester hinzu und rührt weitere 40 min. bei -3 bis -5 °C. Anschliessend werden 20 ml wasserfreies Diäthylamin und weitere 50 ml abs. Toluol zugegeben. Nach 24 h Stehen bei Raumtemperatur wird vom ausgefallenen Sirup dekantiert, mit Äthanol aufgenommen und nach weiteren 24 h auskristallisiertes, nicht umgesetztes Z_3-L-Arginin abgetrennt. Nach längerem Aufbewahren im Kühlschrank kristallisiert das Z_3-L-Arginindiäthylamid aus, zerläuft aber beim Absaugen zu einem zähen Sirup. Das Produkt wird sofort weiterverarbeitet.

L-Arginindiäthylamid x 2 HCl

Die Hydrierung erfolgte in Methanol in Anwesenheit eines etwa 3-fach molaren Überschusses von 0,1 N HCl. (Hydrierkatalysator : Palladium / Aktivkohle) Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel bei 30 °C i.V. abgezogen. Aus Äthanol / Äther und

durch wiederholtes Absaugen mit Äther erhält man ein weißes, amorphes Pulver.

Zersetzungspunkt : 205 °C

$C_{10}H_{23}N_5O \times 2\ HCl$ MG : 302,2

Ber. :	C 39,74	H 8,34	N 23,17
Gef. :	C 39,52	H 8,24	N 22,86

Reinigung von Lecithin aus Eiern

Eine Rohfraktion von Eierlecithin wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten aufgetrennt [23]. Als Laufmittelsystem wurde Chloroform/Methanol/Wasser 65/25/4 (v/v) benutzt. Die Phospholipide wurden durch Besprühen mit einer 10% Lösung von Molybdatophosphorsäure in Äthanol und kurzes Erhitzen im Trockenschrank bei 105 °C sichtbar gemacht. Es erscheinen blaue Flecken auf gelbgrünem Hintergrund. Zum Anfärben der Aminophosphatide wird eine weitere Platte mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und bei 105 °C im Trockenschrank entwickelt.
Es zeigte sich, daß die Rohlecithinfraktion noch einen bedeutenden Anteil von Kephalin (Phosphatidylserin, -äthanolamin) enthielt.

Die Reinigung der Phospholipide erfolgte über eine Kieselgelsäule (2 x 120 cm). Elutionsmittel : Chloroform/Methanol/Wasser 71/25/4 (v/v), Fraktion : 10 ml.
Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert, als Referenz diente DL-α-Phosphatidylcholin-dipalmitoyl. Die entsprechenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer einrotiert, in wenig Lösungsmittel aufgenommen und unter Stickstoff bei +4 °C aufbewahrt.

Reinigung von Phosphatidylinositol

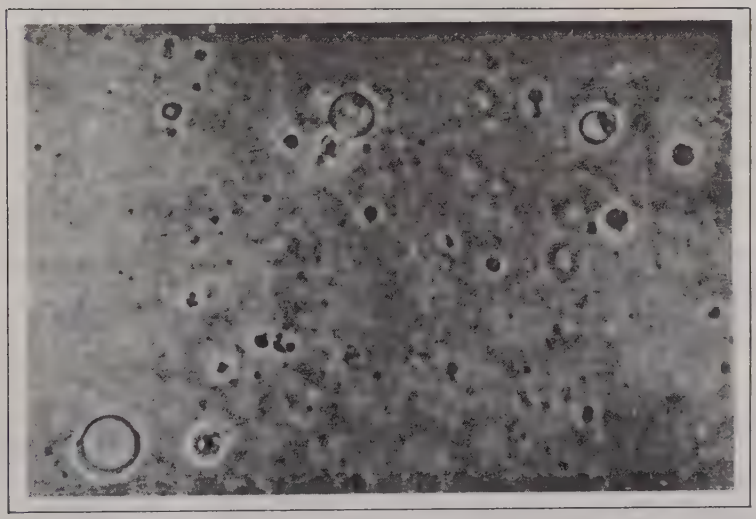
Eine Rohfraktion von Phosphatidylinositol aus Sojabohnen konnte in demselben System fraktionniert werden. Zur Identifizierung der Phosphatidylinositol-Fraktion diente L-α-Phosphatidylinositol.

B. Methoden

1. Darstellung der Liposomen

1.1 Allgemeine Betrachtung

Eine ideale Methode Liposomen herzustellen wäre die, unilamellare Vesikel gleicher Größe zu erhalten, unabhängig von der Art der Lipidzusammensetzung und auch unabhängig von der Eigenschaft der zu verkapselnden Substanz. Weiterhin sollten die Liposomen einen Durchmesser von 0,1 µm - 1,0 µm besitzen [24], die Verkapselungsrate sollte möglichst hoch sein. Die Methode muß selbstverständlich ohne große Schwankungen gut reproduzierbar sein.
Eine solche Methode existiert nicht. Die Eigenschaften der zu verwendenden Lipide, die der zu verkapselnden Substanzen als auch besonders die Wechselwirkungen der beiden Gruppen untereinander, sind zu verschieden, um eine Standardmethode einführen zu können.
Die Auswahl unter doch sehr verschiedenen Methoden, sowie die Berücksichtigung wesentlicher Parameter richtete sich nach zwei Gesichtspunkten: 1. die Eigenschaft der drei zu verkapselnden Substanzen (Peptid, niedermolekulare verbindung mit protonisierbarer Guanidinogruppe) und 2. die Anwendung in einem biologischen Test.



50 µm

Bild 1

Lichtmikroskopische Aufnahme einer heterogenen Liposomensuspension vor der Ultraschallbehandlung.
Lipidzusammensetzung : Phosphatidylcholin-Cholesterin-Stearylamin.
Verkapselte Substanz : Arginindiäthylamid.

Bei der Liposomenherstellung unterscheidet man hauptsächlich drei Verfahren. Die ursprünglich von Bangham et al. [25] eingeführte Methode (hand - shaken - Methode) beruht darauf, daß das Lipidgemisch in einem organischen Lösungsmittel gelöst wird, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen wird und so im verwendeten Rundkolben ein dünner Lipidfilm zurückbleibt. Bei Zugabe einer wässrigen Lösung der zu verkapselnden Substanz bilden sich unter leichtem Umschwenken momentan Liposomen aus, die zum größten Teil multilamellar sind und zudem verschiedene Durchmesser besitzen (Bild 1).

Eine zweite Methode (Hinkle et al. [26]) beruht darauf, daß man organische und wässrige Lösungen unter Verwendung von Detergentien mischt und anschließend gegen einen detergentienfreien Puffer dialysiert. Mit der Entfernung des Detergenz aus der Mischung bilden sich Liposomen aus. Die Anwendung dieser Methode schien wegen der Verwendung von Detergentien nicht ratsam.

Bei der dritten Methode (Deamer [24,27]), die während der Erstellung dieser Arbeit veröffentlicht wurde, wird das in Äther gelöste Lipidgemisch mit einer sehr feinen Nadel in die auf 60 °C erwärmte wässrige Lösung injiziert. Der Äther verdampft sofort, es bilden sich große unilamellare Liposomen aus. Diese

Methode, die in ihren Grundzügen auf Batzri und Korn [28] zurückgeht, war besonders reizvoll, da sie versprach, mit ihr eine einheitliche Liposomensuspension mit großer Verkapselungsrate zu erhalten.

Die Einheitlichkeit der Liposomensuspension mußte bei der hand - shaken - Methode mit Hilfe von Ultraschall hergestellt werden. Bei hinreichender Beschallung sollen sich Mikrovesikel, die unilamellar aufgebaut sind, bilden [29]. Es wurde hierbei die Verwendung eines Ultraschallbades gegenüber einer Sonde aus folgenden Gründen vorgezogen : Die Liposomensuspension kann in demselben Reaktionskolben beschallt werden, in dem sie hergestellt wurde. Damit ist der Arbeitsgang wesentlich vereinfacht, die Gefahr der Oxidation von Lipiden nicht mehr gegeben, da eine schon vorhandene Stickstoffatmosphäre bestehen bleiben kann. Weiterhin sind mögliche Verunreinigungen durch die Sonde selbst natürlich nicht mehr möglich.

Die Größe der Liposomen ist abhängig von der Dauer der Beschallung [29]. Da die Liposomen eine Größe von etwa 0,1 µm - 1,0 µm haben sollen [25], wurde die Suspension solange beschallt, bis die Vesikel lichtmikroskopisch gerade nicht mehr in ihren Konturen erkannt werden konnten. Bei den hier hergestellten Liposomen genügte

dabei eine Beschallzeit von 3 Minuten. Die in der Suspension dann noch enthaltenen wenigen, größeren Partikel wurden durch ein 1,2 µm Millipore Filter abgetrennt. Die so erhaltene Suspension dürfte weitgehend einheitlich sein, der Durchmesser der Liposomen in der erwünschten Größenordnung liegen [29].

Eine weitere Möglichkeit, eine einheitliche Suspension herzustellen, wäre die Anwendung der Gelfiltration mit z.B. Sepharose 4 B gewesen [30], doch gibt es Gründe, die gegen diese Methode sprechen : Es ist schwieriger, Verunreinigungen zu vermeiden [31], es muß mit Substanzverlust gerechnet werden [30], die Methode ist wesentlich aufwendiger. Ein Vorteil liegt darin, daß mit der Auftrennung der verschiedenen Liposomen über die Säule eine mit Sicherheit einheitlichere Suspension gewonnen wird und daß gleichzeitig nicht verkapselte Substanz entfernt werden kann.

Das Problem, überschüssige, nicht verkapselte Substanz zu entfernen, wurde im vorliegenden Fall mit Hilfe der Ultrazentrifugation gelöst [16]. Die Liposomen wurden solange mit Puffer gewaschen und abzentrifugiert, bis im Überstand kein oder nur unwesentlich wenig zu verkapselnde Substanz nachgewiesen werden konnte. Es genügte dabei meistens ein viermaliges Zentrifugieren.

Die Lipidzusammensetzung der Liposomen ist von großer Bedeutung, auch gerade dann, wenn niedermolekulare Substanzen verkapselt werden sollen [18]. Die Permeabilität der Lipiddoppelschicht für bestimmte Substanzen beruht auf der Wechselwirkung der Lipide untereinander wie auch auf Wechselwirkungen der Lipide mit den zu verkapselnden Substanzen.
Die Ausgangszusammensetzung bestand in allen Fällen aus Phosphatidylcholin : Cholesterin im molaren Verhältnis 7:2. Da Cholesterin die Permeabilität der durch Phospholipide gebildeten Membran herabsetzt, wurde sein Anteil als unerläßlich betrachtet [32]. Phosphatidylcholin wurde als gereinigte Substanz aus Eier - Lecithin wie auch als Rohprodukt, mit einem wesentlichen Anteil Kephalin, eingesetzt. Zudem wurde Dipalmitoyl - Phosphatidylcholin getestet, das die Permeabilität der Liposomen nochmals herabsetzen sollte [18].

Ein besonderes Interesse aber lag in der Herstellung positiv und negativ geladener Liposomen. Der Anteil geladener Lipide sollte dabei nicht mehr als 10% der Gesamtlipidmenge ausmachen [33]. Um die einzelnen Komponenten besser miteinander vergleichen zu können, wurden für alle Versuche das molare Verhältnis Phosphatidylcholin : Cholesterin : geladenes Lipid

mit 7 : 2 : 1 festgelegt. Die positiven bzw. negativen Lipide waren : Dicetylphosphat, Stearylamin und Phosphatidylinositol.

Die quantitative Bestimmung der verkapselten Substanzen konnte über den Guanidino - Gehalt der Verbindungen nach Sakaguchi erfolgen, (Rosenberg - Variante [34]). Die Methode mußte allerdings variiert werden, da die Liposomen vor der Bestimmung ihres Inhalts aufgebrochen werden mußten. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge n-Propanol zum Reaktionsansatz konnte die Verwendung von Detergentien vermieden werden: Die Liposomen werden mit Hilfe von n-Propanol als Lösungsvermittler aufgelöst. Der Test wird dabei durch den erhöhten Anteil von n-Propanol nicht beeinträchtigt. Die Substanzmenge, die tatsächlich verkapselt worden ist, wird angegeben als verkapseltes Volumen in Bezug auf die eingesetzte Lipidmenge (µl / µMol Lipid) und als % der ursprünglich eingesetzten Substanzkonzentrationen. (Ausgangskonzentration bei allen Versuchen : 500 mg / 20 ml). Bei den biologischen Versuchen wird die tatsächlich eingesetzte Menge in mg oder µMol / Versuchsansatz angegeben.

1.2. Herstellung von Liposomen nach der hand - shaken - Methode.[25)]

200 µMol Phosphatidylcholin, 57 µMol Cholesterin und gegebenenfalls 28,5 µMol Phosphatidylinositol, Stearylamin oder Dicetylphosphat (molares Verhältnis 7:2:1) werden in 30 ml Chloroform in einem 1 l Rundkolben gelöst. Das Lösungsmittel wird bei 37 °C am Rotationsverdampfer abgezogen. Der sich dabei an der Rundkolbenwandung ausgebildete sehr dünne Lipidfilm wird mit Stickstoff begast, dann mit einer Lösung von 500 mg zu verkapselnder Substanz in 20 ml 3mM Kalium-Phosphat Puffer p_H 7,2 versetzt. Es wird nochmals mit Stickstoff begast, dann der gut verschlossene Kolben leicht geschwenkt. Der Lipidfilm löst sich langsam von der Wandung, es bildet sich eine milchige Suspension aus. Nach 2-stündigem Stehen wird im Ultraschallbad bei 0 - 4 °C drei Minuten lang bei dreimaligem Umschwenken beschallt. Die Änderung der Liposomenstruktur kann durch Probeentnahme zum gewünschten Zeitpunkt lichtmikroskopisch verfolgt werden.
Nach weiterem 2-stündigen Stehen werden die Liposomen abzentrifugiert, (SpincoL 50, 1 Stunde bei 100 000 x g), der Überstand verworfen, die Liposomen in 20 ml 3mM Kalium - Phosphat Puffer p_H 7,2 aufgenommen, wenige Sekunden bis zu einer gleichmäßigen Suspension

gevortext und wiederholt zentrifugiert. Dieses " Waschen " wird sooft wiederholt, bis im Überstand keine oder nur unwesentlich wenig Substanz nachzuweisen ist.

Der Liposomenpellet der letzten Zentrifugation wird in 5 ml 6,7mM Kalium - Phosphat Puffer p_H 7,2 aufgenommen und unter Stickstoff bei +4 °C aufbewahrt. In gleicher Weise werden jeweils leere Liposomen angefertigt, wobei lediglich die Zugabe zu verkapselnder Substanz unterbleibt. Verwendung finden die Liposomen in den in vivo und in vitro Versuchen am Tag nach ihrer Fertigstellung.
Besonderheit : Liposomen bilden sich spontan nur dann aus, wenn das Strukturlipid sich oberhalb der Übergangstemperatur befindet [35]. Bei Verwendung von Dipalmitoyl - Phosphatidylcholin (Übergangstemperatur +41 °C) erfolgte die Zugabe der wässrigen Lösung bei +50 °C. Nach Ablösen des Lipidfilms läßt man auf Zimmertemperatur abkühlen. Weitere Behandlung wie oben beschrieben.

1.3. Herstellung von Liposomen durch Injektion einer ätherischen Lipidlösung in die wässrige Phase: Injektionsmethode.[24,27)]

In einem 1 l Rundkolben, der sich in einem Wasserbad von 60 °C befindet, werden 500 mg zu verkapselnde Substanz in 20 ml 3mM Kalium - Phosphat Puffer p_H 7,2 gelöst. Unter Rühren und Stickstoffbegasung wird die in B.1 beschriebene in Äther gelöste Lipidmischung durch eine feine Nadel mit Hilfe einer Schlauchpumpe injiziert. Dauer der Injektion: 30 min. Die entstandene Suspension wird auf Raumtemperatur abgekühlt und noch weitere 2 Stunden unter Stickstoff stehengelassen. Die weitere Behandlung, Beschallung und Ultrazentrifugation wird wie unter 1.2. beschrieben durchgeführt.

1.4. Quantitative Bestimmung der in Liposomen verkapselten Substanz.

Die drei verkapselten Substanzen Arginindiäthylamid, Agmatin und Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 konnten auf Grund ihrer Guanidinogruppen nach der von Rosenberg variierten Methode von Sakaguchi bestimmt werden [34)]. Wie unter B.1 beschrieben mußte die Methode etwas variiert werden.

Reagenz : 2,5g α-Naphtol in einem 50 ml Meßkolben in wenig n- Propanol gelöst.
+ 1,25 ml einer 1% wässrigen Diacetyllösung
+ n-Propanol ad 50 ml aufgefüllt.

Stammlösung zur Erstellung einer Eichgeraden:
jeweils 10 mg der entsprechenden Substanz in 10 ml H_2O dest.

Durchführung der Bestimmung :

Nacheinander werden in Reagenzgläser pipettiert:

2 ml H_2O	für Leerwert und Probe
(2-x)ml H_2O	für Eichlösungen(E) und Rückstandsmessung(R)
	x_E = 10 µl - 50 µl ; x_R = 20 µl
x µl Eichlsg. bzw. Rückstand	für Eichlösungen und Rückstandsmessung.
20 µl leere Liposomensuspension	für alle Lösungen außer Probe
20 µl Liposomensuspension	für Probe

+ 0,5 ml 3M NaOH
+ 0,5 ml n-Propanol
+ 1,0 ml Reagenz

Es wird kräftig geschüttelt und nach 30 min. bei

546 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Meßwerte der Eichkurve liegen exakt auf einer Geraden und sind für jede Substanz und Lipidzusammensetzung gut reproduzierbar.

2. In vivo Messung des [U-^{14}C] -Glucose-Einbaus am Diaphragma und am Nebenhodenfettkörper der Maus.

Beschreibung des biologischen Systems.

Zur Messung der biologischen Aktivität konnte in den Grundzügen ein von Rafaelsen et al. [14,36] entwickelter Test benutzt werden.
Er hatte festgestellt, daß bei Ratten die intraperitoneale Injektion schon sehr geringer Dosen Insulin zusammen mit einer Spur [U-^{14}C] -Glucose zu einem deutlichen Anstieg markierter Glucose im Zwerchfell und im epididymalen Fettgewebe führt.
Die Methodik der Liposomenherstellung und die Konzentration der verkapselten Substanzen haben allerdings eine Verwendung der Ratte als Versuchstier ausgeschlossen.
Einer eindeutigen Aussage innerhalb einer Versuchsreihe wegen, wurde der für Insulin und insulinähnliche Substanzen sehr empfindliche Test umgearbeitet und für die Maus als Versuchstier neu standardisiert.
Als Parameter einer evtl. insulinähnlichen Aktivität dienten die Aufnahme radioaktiv markierter Glucose durch Zwerchfell und epididymales Fettgewebe, ausgedrückt in cpm/g Naßgewicht, sowie die Änderung des

Blutglucosespiegels. Bezugspunkte waren jeweils der entsprechende Leerwert (Injektion lediglich von [U-^{14}C] -Glucose) und die durch Insulin maximale Stimulierung.

Es wurden durchweg männliche Albinomäuse Stamm NMRI, Versuchstierzuchtanstalt Tuttlingen, mit einem Gewicht zwischen 22 und 27g verwendet. Es zeigte sich, daß dann auf eine individuelle, gewichtsbezogene Dosierung der zu testenden Substanz verzichtet werden konnte.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die durch Insulin maximal erreichbare Stimulierung des Zwerchfells und des epididymalen Fettgewebes bei einer Konzentration von 2 µg/Maus (= 46 mIU) lagen. Höhere Konzentrationen führten nur noch zu einer Änderung des Blutglucosespiegels. (Senkung). Die Aktivität der als tracer eingesetzten [U-^{14}C] -Glucose betrug in allen in vivo Versuchen 0,3 µCi/Maus.

Durchführung

Männliche Albinomäuse (Stamm NMRI, Versuchstierzuchtanstalt Tuttlingen) von 22 - 27g Gewicht wurden 18 - 2o Stunden nüchtern gesetzt. Dann wurde die Einheitsdosis intraperitoneal injiziert.

Einheitsdosis I : die zu testende Substanz bzw. 2,0 µg Rinderinsulin + 0,3 µCi [U-^{14}C] -Glucose in 0,5 ml Ringerlösung.

Einheitsdosis II : (gilt für Versuche mit Liposomen) gleiche Aktivitäten in einem Gesamtvolumen von 0,8 ml, davon 0,5 ml Liposomensuspension.

Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Tiere durch Genickschlag getötet und decapitiert. Das abfließende Blut wurde in heparinisierten Plastikröhrchen aufgefangen und 100 µl davon für die Blutglucosebestimmung entnommen.

Den decapitierten Mäusen wurden ungefähr 50 mg Nebenhodenfett entnommen, das Zwerchfell mit Rippenbogen herausgeschnitten und der Rippenbogen entfernt. Die Gewebeproben wurden in vorgewogene Scintillatorgefäße überführt, zurückgewogen und mit je 0,5 ml Oxidationslösung 60 min im Wasserbad bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Gefäße mit je 20 ml Scintilatorgemisch gefüllt und im Flüssigkeits-Scintillationszähler ausgezählt. Die dabei erhaltenen Zählwerte wurden durch die Gewebeeinwaagen dividiert und die so erhaltenen relativen ^{14}C - Aktivitäten (cpm/g) ins Verhältnis zu den entsprechenden Insulinwerten gesetzt. Die gleichzeitig ermittelten Aktivitäten der Leerwerte wurden dabei vorher von den Proben- bzw. Insulinwerten subtrahiert. Die so erhaltenen Probenwerte in % des Insulinwertes beziehen sich also, wenn nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben wird, auf den Leerwert = 0% und den Insulinwert = 100%.

Lösungen :

Oxidationsgemisch : 33 ml Perchlorsäure (70 %)
67 ml H_2O_2 (30 %)

Scintillationsgemisch : 6g PPO in einem Gemisch von
1 l Cellosolve und 1 l Toluol.

Bei den folgenden Untersuchungen mit Liposomensuspensionen war eine freie Wahl der verkapselten Substanzkonzentrationen sehr eingeschränkt. Es wurde darauf Wert gelegt, die pro Versuchstier verabreichte Lipidmenge weitgehend konstant zu halten, um mögliche Stoffwechseleffekte auf Grund schwankender Lipidkonzentrationen auszuschalten. So betrug die pro Versuchstier applizierte Gesamtmenge an Lecithin + Cholesterin bei jedem Versuch 16,6 $\pm$ 0,6 mg. Damit war die höchste zu verabreichende Dosis durch die bestmöglichste Verkapselung schon festgelegt.
Außerdem wurde bei jedem Versuch auch die Aktivität des entsprechenden leeren Liposoms bestimmt.

3. Messung der [1-^{14}C] -Glucose-Oxidation an isolierten Fettzellen des Nebenhodenfettkörpers der Ratte.

Die Versuche wurden nach einer bereits detailliert beschriebenen Methode durchgeführt[11].

Prinzip :

Die biochemische Wirkung des Insulins auf Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel in der Fettzelle beruht neben der Steigerung des transmembranären Glucosetransports vor allem auf einer Aktivierung des Glucoseflusses durch den Pentosephosphatweg. Damit können die für die vermehrte Fettsäurebiosynthese erforderlichen Reduktionsäquivalente bereitgestellt werden.

Werden nun die aus dem epididymalen Fettgewebe isolierten Fettzellen mit 1-^{14}C markierter Glucose und Insulin bzw. der zu testenden Substanz inkubiert, so wird über den Pentosephosphatweg dieses markierte C-Atom als CO_2 eliminiert.

Die Menge des entstandenen $^{14}CO_2$, das an Hyamin gebunden ausgezählt werden kann, ist damit ein direktes Maß zur Bestimmung der biologischen Insulinaktivität in diesem System.

4. Messung der [U-^{14}C] -Glucoseaufnahme am isolierten Hemidiaphragma der Ratte.

Beschreibung des biologischen Systems

Die hier entwickelte Methode zur Bestimmung insulinähnlicher Aktivitäten im isolierten Diaphragma der Ratte beruht u.a. in ihren Grundzügen auf Arbeiten von Kipnis und Cori [37] sowie Fulks et al. [38]. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß von entscheidender Bedeutung zur Standardisierung der Methode die Verwendung von Hemidiaphragmen ist, die mitsamt den entsprechenden Rippenbögen inkubiert werden. Folglich mußte bei Benutzung dieser sogenannten " intact diaphragms " darauf verzichtet werden, den Glucoseschwund im Medium zu messen. Stattdessen wurde dem Inkubationsmedium eine Spur [U-^{14}C] -Glucose zugegeben und dessen Einbau in das Diaphragma als cpm / g Naßgewicht ermittelt. Dabei wurde keine Unterscheidung getroffen zwischen Glucoseaufnahme, Glykogengehalt und anderen Stoffwechselprodukten.

Die basale Glucoseaufnahme war bei den einzelnen Tieren unterschiedlich. So diente zur Aktivitätsbestimmung jeweils ein Paar Hemidiaphragmen desselben Tieres, wobei jeweils ein Hemidiaphragma den Kontroll-

wert darstellte. Die Ergebnisse werden demnach ausgedrückt in cpm / g = cpm / g Probe - cpm / g Kontrolle. Zum Vergleich und zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Methode wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Rinderinsulin aufgestellt.

Durchführung:

Männliche Ratten (Stamm Sprague - Dawley, Versuchstierzuchtanstalt Tuttlingen) von 100g - 120g Gewicht werden 24 Stunden nüchtern gesetzt. Die Tiere werden durch Genickschlag getötet, das Diaphragma mit Rippenbogen herauspräpariert und sofort in eiskaltem Puffer I gewaschen. (Puffer I : Krebs - Ringer - Bicarbonat - Puffer, p_H 7,4 , Gehalt an Glucose : 11,1 mM). Im Puffer werden mit einer sehr scharfen Schere mit jeweils zwei Schnitten die beiden Hemidiaphragmen mitsamt Rippenbogen herauspräpariert, kurz auf Filterpapier abgetupft und sofort in vorbereitete Plastikgläschen gegeben, die jeweils 3 ml auf 37 °C erwärmten Puffer I enthalten.
Die Gläschen werden fest verschlossen, die Probe 5 min mit Carbogen begast und weitere 25 min im Schüttelbad bei 37 °C präinkubiert. Nach dieser Zeit werden die Hemidiaphragmen entnommen, kurz auf Filtrierpapier abgetupft und in Plastikgläschen gegeben, die 3,2 ml auf 37 °C erwärmtes Inkubationsmedium enthalten.

Das Inkubationsmedium besteht aus 3 ml Puffer II (Puffer II : Krebs - Ringer - Bicarbonat - Puffer, p_H 7,4, Gehalt an Glucose 11,1 mM, einschließlich 0,92 µCi [U-^{14}C] -Glucose, auf einen Probenansatz bezogen) + 0,2 ml Insulinverdünnung oder Liposomensuspension in Ringerlösung, bzw. 0,2 ml Ringerlösung für die Kontrollwerte.

Die Proben werden wiederum 5 min. mit Carbogen begast und anschließend gut verschlossen weitere 55 min. im Schüttelbad bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Hemidiaphragmen gründlich mit eiskaltem Puffer I gespült und auf Filtrierpapier unter leichtem Andrücken kurz getrocknet. Nun werden die Diaphragmen vom Rippenbogen getrennt, in Scintillatorgefäße überführt und das Naßgewicht bestimmt. Die Gewebe werden mit je 0,5 ml Oxidationslösung versetzt und 60 min bei 80 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Gefäße mit 20 ml Scintillatorflüssigkeit gefüllt und im Flüssigkeits - Scintillationszähler ausgezählt.

III. ERGEBNISSE

A. Ergebnisse der Verkapselungen

1. Ergebnisse der Verkapselungen nach der hand - shaken - Methode [25].

Es mußte damit gerechnet werden, daß die Verkapselungsrate bei kleineren Molekülen nicht so hoch sein würde wie z. B. bei Proteinen. Denn man kann davon ausgehen, daß die Permeabilität der Liposomen für Proteine geringer ist als für kleinere Moleküle. Die Versuche sollten daher auch zeigen, in wie weit die Verkapselungsrate von der Größe der verkapselten Moleküle abhängt. Dieser Faktor ist bei Verkapselungen von hochmolekularen Verbindungen von weniger großem Interesse.
Aus Tabelle (1) ist zunächst ersichtlich, daß die Ergebnisse an verschiedenen Versuchstagen unter sonst gleichen Bedingungen doch erheblichen Schwankungen unterworfen sind. Innerhalb dieser angegebenen Schwankungsbreite allerdings sind die Werte reproduzierbar.
Es muß festgestellt werden, daß die Verwendung von gereinigtem Phosphatidylcholin (PC) gegenüber dem Rohextrakt (PC_r) keinen wesentlichen Einfluß ausübt.

Ergebnisse der Verkapselungen nach der hand - shaken - Methode
Versuchsanordnung s. Kap. B.1.2. und B.1.4.

		Verkapselungsrate	
Substanz	Lipidzusammensetzung	% der Ausgangskonzentration	µl/µMol Lipid
Arginindiäthylamid	PC_r/CH	0,3 - 0,6 2.0	0,23 - 0,47
	PC/CH	0,3 - 0,6	0,23 - 0,47
	PC/CH/ST	0,8 - 1,1	0,56 - 0,71
	PC/CH/DCP	0,5	0,35
Agmatin	PC/CH/PI	0,25 - 0,6	0,17 - 0,42
	PC/CH	0,5	0,39
	DPC/CH/ST	2,1 - 3,3	1,49 - 2,3
	DPC/CH/ST unbeschallt	3,8	2,7
	DPC_r/CH/ST	2,0	1,44
Arg-Gly-Phe Phe-NH_2	PC/CH	0,5 - 1,5	0,39 - 1,17
	PC/CH/PI	1,05 - 2,6	0,87 - 1,87

Verwendete Abkürzungen : PC = Phosphatidylcholin, PC_r = Phosphatidylcholin Rohfraktion, CH = Cholesterin, DPC = Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin, ST = Stearylamin, PI = Phosphatidylinositol, DCP = Dicetylphosphat
S = Standardabweichung, P = Signifikanz (Student`s t-Test)

Tabelle 1

Vielmehr ist bei Verwendung von "rohem" Phosphatidylcholin in einem Fall eine erhebliche Zunahme der Verkapselungsrate festzustellen. Dieses Ergebnis ist, da es aus der allgemein zu erhaltenen Verkapselungsrate herausfällt, gesondert aufgeführt.

Die Möglichkeit, die Permeabilität der Liposomen durch Verwendung von Phospholipiden mit möglichst gesättigten Fettsäuren herabzusetzten, ist bei Verwendung von Dipalmitoyl - Phosphatidylcholin(DPC) getestet worden. Es zeigte sich, daß bei der Verkapselung von Agmatin der Einbau von Dipalmitoyl - Phosphatidylcholin zu einer erhöhten Verkapselungsrate führt. Jedoch ist die Steigerung nicht so groß, als daß man von einem wesentlichen Effekt sprechen könnte.

Von entscheidender Bedeutung ist vielmehr der Zusatz von Komponenten, die eine Ladung tragen. Es zeigte sich bei der Verkapselung von Arginindiäthylamid, daß negativ geladene Liposomen (Zusatz von Dicetylphosphat) keine Erhöhung der Einbaurate der positiv geladenen Substanz bewirken. Der Einbau ist vielmehr stark erhöht, wenn Liposomen und zu verkapselnde Substanz die gleiche (positive) Ladung tragen. (Zusatz von Stearylamin, ST). Dieser Effekt ist bei der Verkapselung von Agmatin von besonderer Bedeu-

tung. Gleichzeitig beweisen diese Ergebnisse, daß es sich bei diesen Verkapselungen um echte Einschlüsse handelt und nicht um Wechselwirkungen Lipid - Guanidinoverbindung, die auf elektrostatischer Anziehung beruhen. Eine Beladung der Liposomen mit Substanz auf ihrer äußeren Membran dürfte damit ausgeschlossen sein. Damit ist auch erklärt, warum das negativ geladene Phosphatidylinositol nicht zu einer erhöhten Einbaurate bei der Verkapselung von Agmatin führt.

Die Befunde bei der Verkapselung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 sind nicht eindeutig zu interpretieren, jedoch können elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden.

2. Ergebnisse der Verkapselungen nach der Injektionsmethode.

Die nach Deamer [24,27] modifizierte Methode hat im vorliegenden Falle die Erwartungen nicht erfüllt, wie aus Tabelle (2) ersichtlich ist. Einerseits ist zwar der apparative Aufbau von dem Deamers verschieden, andererseits aber beziehen sich die von ihm erhaltenen Werte (14 $\mp$ 6 μl / μMol Lipid) auf negativ geladene Liposomen ; als zu verkapselndes Material

diente der verwendete Puffer. (Phosphat- oder Chromationen als meßbare Parameter). Es läßt sich wohl aus diesen Ergebnissen der Schluß ziehen, daß, in Bezug auf die Verkapselungsrate, weniger die Methode als vielmehr das verwendete Material von entscheidender Bedeutung ist.

Ergebnisse der Verkapselungen nach der Injektionsmethode. Versuchsanordnung s. Kap. B. 1.3., B. 1. 4.

Substanz	Lipidzusammensetzung	µl/ µMol Lipid
Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2	PC/CH	0,54 - 0,93
Agmatin	PC/CH	0,74
Glucose	PC/CH	3,9 - 4,7

Tabelle 2

In einem Zusatzversuch wurde diese Feststellung noch untermauert. Es wurde Glucose verkapselt. Die Konzentration der Glucose betrug unter sonst gleichen Bedingungen 100 mg / 100 ml, die Bestimmung erfolgte nach der GOD-Perid Methode, wobei die Liposomen durch einen Zusatz von 0,5 ml n-Propanol aufgelöst wurden. Dieser Zusatz hatte keinen Einfluß auf den eigentlichen Test.

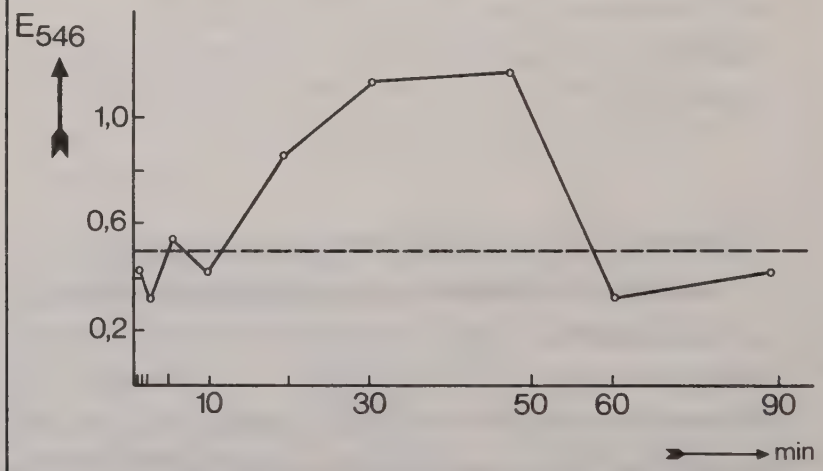
Die verhältnismäßig hohe Verkapselungsrate für Glucose

gegenüber der von Agmatin und von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 unterstreicht den Befund, daß neben der Lipidzusammensetzung die Eigenschaften der zu verkapselnden Substanzen selbst von entscheidender Bedeutung sind.

B. Wirkung von Arginindiäthylamid auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus.

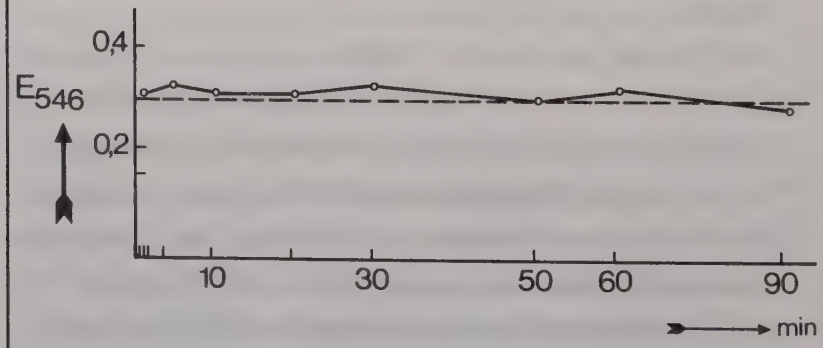
Die stark voneinander abweichenden Ergebnisse, die die Versuche mit Arginindiäthylamid in vivo und in vitro erbrachten, ließen die Vermutung einer schnellen Eliminierung bzw. Inaktivierung im Organismus aufkommen. In einigen Stichversuchen wurde versucht, diese These zu stützen.

Einer Gruppe von jeweils 4 Mäusen wurden 6 mg Arginindiäthylamid in 0,5 ml Ringer-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 60 und 90 Minuten wurden die Tiere decapitiert, das Blut in heparinisierten Plastikröhrchen aufgefangen, der Harn durch Punktion der Blase gewonnen. Sodann wurden Harn und Serum dünnschichtchromatographisch auf CEF-DC-Platten auf die Anwesenheit von Arginindiäthylamid untersucht.
Laufmittel : Butanol / Eisessig / Pyridin / Wasser



Bestimmung von Guanidinogruppen im Harn.

——————— Wert für unbehandelte Mäuse.



Bestimmung von Guanidinogruppen im Serum.

Abbildung 1: Bestimmung von Guanidinogruppen in Harn und Serum von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von 6 mg Arginindiäthylamid. Versuchsanordnung Seite 35, 37.

(15 : 10 : 3 : 12). Angefärbt wurde mit dem Sakaguchi-Reagenz [39].

Weiterhin wurden Harn und Serum auf vorhandene oder vermehrte Guanidino-Verbindungen nach der von Rosenberg variierten Sakaguchi-Methode [34] getestet.

Aus Abbildung (1) ist ersichtlich, daß diese nur der Anschauung dienende halbquantitaive Bestimmung dennoch folgende Schlüsse zuläßt :

1. Arginindiäthylamid ist als Guanidinoverbindung trotz Injektion hoher Dosen im betrachteten Zeitraum im Serum nicht nachweisbar.
2. Arginindiäthylamid ist als Guanidinoverbindung in hoher Konzentration im Harn nachweisbar. Es dürfte innerhalb der 1. Stunde mit dem Harn ausgeschieden werden.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erbrachte folgende Resultate :

Arginindiäthylamid ist im Serum nicht nachweisbar, im Harn zeigt sich nach 30 und nach 40 min die mit dem Sakaguchi-Reagenz charakteristische Anfärbung des Arginindiäthylamid. Der Rf-Wert entspricht dem des Referenzwertes. Arginindiäthylamid dürfte somit größtenteils chemisch unverändert im Harn ausgeschieden werden.

Tabelle 3

Wirkung von Argininindiäthylamid, Liposomen und von in Liposomen verkapseltem Argininindiäthylamid auf die Glucoseaufnahme im Mäusediaphragma. Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2.

Substanz	Lipidzusammensetzung	Konzentration von Argininindiäthylamid	n	cpm/g	s	% Insulinwirkung	p
Leere Liposomen	PC_r/CH		12	4533	1683	4,4	
Leere Liposomen	PC/CH		13	4362	1842	3,7	
Liposomen	PC/CH	3,3 µM	8	15607	6851	50,1	$<0,001$
Liposomen	PC/CH	1,0 µM	12	8769	2993	21,9	$<0,001$
Liposomen	PC/CH	0,6 µM	14	3998	1533	2,2	
Leere Liposomen	PC/CH/ST		9	3047	1211	- 1,7	
Liposomen	PC/CH/ST	1,3 µM	18	5854	2610	9,9	$<0,005$
Insulin 2 µg			12	27685	6116	100,0	$<0,001$
Leerwert			16	3458	788	0	

Argininindiäthylamid : in vitro Aktivität am isolierten Rattendiaphragma = 73,3% max. Insulinaktiv.

Äv. s. Tab. (1)

Wie beschrieben, (Kapitel III A) wurde Argininditäthylamid in drei verschieden zusammengestzten Liposomen verkapselt. Es ergaben sich dadurch bei in etwa konstanter Menge Lipid, bei gleichem Verhältnis Lecithin : Cholesterin, verschiedene Konzentrationen der verkapselten Substanz. Die Zeit zwischen Injektion und Probeentnahme betrug zwischen 60 und 90 min. Eine Abhängigkeit der Glucoseaufnahme von der Zeit war in diesem Zeitraum nicht festzustellen, so daß die Ergebnisse zeitlich verschiedener Versuchsreihen zusammengefaßt werden konnten.
Tabelle (3) gibt die Versuchsergebnisse am Mäusediaphragma wieder, wobei die in vitro erhaltenen Daten von Weitzel et al. [13] der besseren Übersicht wegen mit aufgeführt wurden.
Folgende Schlüsse lassen sich aus der Zusammenstellung ziehen : die in vitro Aktivität des Argininditäthylamid am Rattendiaphragma kann in vivo am Mäusediaphragma bestätigt werden, wobei sich eine Dosisabhängigkeit zeigt. Gleichzeitig haben sich die Liposomen als sehr gute carrier in diesem System erwiesen. Eine geringe Wirkung zeigen schon leere Liposomen, die aus Lecithin und Cholesterin aufgebaut sind. Dabei ist es unwesentlich, ob das Lecithin gereinigt ist oder nicht.

Ein Zusatz von Stearylamin läßt diese Wirkung der leeren

Wirkung von unverkapseltem Arginindiäthylamid im Diaphragma der Maus. Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2. t = 1,5 h

[c] Substanz	Leerwert	5 µM	10 µM	15 µM	20 µM
cpm/g	1540	1955	1497	2149	2130

Jeder Wert ist Mittelwert aus 4 Einzelmessungen

Tabelle 4

Wirkung von Arginindiäthylamid und Liposomen in Fettzellen Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2.

Substanz	Lipidzusammensetzung	n	cpm/g	s	[c] Arginindiäthylamid
Leere Liposomen	PC_r/CH	18	2444	528	
Leere Liposomen	PC/CH	10	2286	814	
Leere Liposomen	PC/CH/ST	10	3086	835	
Insulin 2 µg		12	9911	1665	
Liposomen	PC/CH	9	2566	1374	3,3 µM
Liposomen	PC/CH	9	2478	527	1,0 µM
Liposomen	PC/CH	9	2784	356	0,6 µM
Liposomen	PC/CH/ST	12	2806	567	1,3 µM
Leerwert		5	2657	435	

Abk. s. Tab. (1)

Tabelle 5

Liposomen verschwinden, wirkt aber auch gleichzeitig hemmend auf die Wirkung des Arginindiäthylamid. Damit ist schon ein Hinweis darauf gegeben, daß Stoffwechseleffekte der Liposomen selbst nicht unberücksichtigt gelassen werden dürfen.

Unverkapseltes Arginindiäthylamid zeigte, wie auch bei Ratten, am Mäusediaphragma keine Wirkung. (Tabelle (4)) Zusätzliche Versuche zeigten bei Zugabe von unverkapseltem Arginindiäthylamid zu leeren Liposomen ebenfalls keine Aktivitätssteigerung, so daß der aufgezeigte Effekt tatsächlich verkapseltem Arginindiäthylamid zugeschrieben werden muß.

Tabelle (5) zeigt die Ergebnisse der Versuche im epididymalen Fettgewebe. Auffallend ist die in diesem System geringe in vivo Empfindlichkeit des Fettgewebes im Vergleich zur in vitro Stimulierbarkeit isolierter Fettzellen, wie auch gegenüber der Stimulierbarkeit des Diaphragma.

Die ohnehin geringe in vitro Aktivität des Arginindiäthylamid (7,5 %, Versuch ist hier nicht beschrieben) kann hier nicht mehr bestätigt werden. Die Ergebnisse sind somit im Einklang mit denen an Ratten in vivo ermittelten Werten [14].

C. Wirkung von Agmatin auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus.

Bei der Interpretation der in vivo Ergebnisse am Mäusediaphragma mußte von vorneherein berücksichtigt werden, daß ohne den Zusatz von Stearylamin die Verkapselungsrate nur sehr gering war. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß Stearylamin auch hier, wie bei den Versuchen mit Arginindiäthylamid, eine hemmende Wirkung ausüben kann.
Von großem Interesse war auch, eine eventuelle Abhängigkeit der Liposomengröße von der biologischen Aktivität aufzuzeigen. Daher wurden in einer Versuchsreihe unbeschallte Liposomen in den Test eingesetzt.
In Tabelle (6) und (7) sind die Versuchsergebnisse zusammengefaßt. Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß auch wie im Falle des Arginindiäthylamid die carrier-Funktion der Liposomen als auch die damit verbundene in vivo Aktivität des Agmatin aufgezeigt werden kann. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, daß die Aktivität nicht nur dosisabhängig ist, sondern auch in entscheidenem Maße von der Lipidzusammensetzung und Größe der Liposomen abhängt. So scheinen " starre " Liposomen, d.h. Liposomen mit großem Anteil gesättigter Fettsäuren, vom Diaphragma besser aufgenommen zu werden. Die Aufnahmebereitschaft des Gewebes für große Liposomen

Wirkung von Agmatin, Liposomen und von in Liposomen verkapseltem Agmatin auf die Glucoseaufnahme im Mäusediaphragma. Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2.

Substanz	Lipidzusammensetzung	n	Agmatin [c]	cpm/g	s	% Insulinwirkung	p *
Leere Liposomen	PC/CH	6		2136	1064	0	
Liposomen	PC/CH	10	1,1 µM	3531	875	8,1	$<$0,01
Leere Liposomen	PC/CH/ST	6		2631	732	0	
Liposomen	PC/CH/ST	6	4,0 µM	4064	1252	11,2	$<$0,005
Insulin 2 µg		6		19350	1136	100	$<$0,001
Leerwert		6		2786	613		

*gegen die entsprechenden Leeren Liposomen

Abk. s. Tab. (1)

Tabelle 6

Tabelle 7

Wirkung von Agmatin, Liposomen und von in Liposomen verkapseltem Agmatin auf die Glucoseaufnahme im Mäusediaphragma. Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2.

Substanz	Lipidzusammensetzung	[c]Agmatin	n	cpm/g	s	% Insulinwirkung	p*
Leere Liposomen	DPC/CH/ST		5	2883	897	0	
Liposomen	DPC/CH/ST beschallt	4,0 µM	7	7369	3287	27,2	< 0,01
Liposomen	DPC/CH/ST nicht beschallt	8,0 µM	7	4112	1357	7,4	< 0,05
Liposomen	DPC/CH/ST beschallt	7,2 µM	7	5319	2182	14,79	< 0,05
Leerwert			6	2786	613	-0,5	
Insulin 2 µg			6	19350	1136	100	< 0,001
Agmatin		4,0 µM	10	3083	660	2,5	
Agmatin		8,0 µM	5	3286	633	2,6	
Agmatin		7,2 µM	5	2802	648	0,9	

* gegenüber Leeren Liposomen

Abk. s. Tab. (1)

Wirkung von Agmatin, Liposomen und von in Liposomen verkapseltem Agmatin auf die Glucoseaufnahme im epididymalen Fettgewebe der Maus. Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 2.

Substanz	Lipidzusammensetzung	[c] Agmatin	n	cpm/g	s	
Leere Liposomen	DPC/CH/ST		7	2790	732	
Liposomen	DPC/CH/ST beschallt	4,0 µM	7	4301	1480	= 21% max. Insulin-
Liposomen	DPC/CH/ST unbeschallt	8,0 µM	7	3802	1385	= 14% wirkung
Liposomen	DPC/CH/ST beschallt	7,2 µM	7	3373	990	
Leere Liposomen	PC/CH/ST		10	3086	835	
Liposomen	PC/CH/ST	4,0 µM	7	2459	859	
Leere Liposomen	PC/CH		18	2444	528	
Liposomen	PC/CH	1,0 µM	7	1897	637	
Leerwert			5	2657	435	

Abk. s. Tab. (1)

Tabelle 8

scheint hingegen stark reduziert zu sein.
Die Interpretationsmöglichkeiten für die Versuche am epididymalen Fettgewebe (Tabelle (8)) können hier nur einen groben Überblick geben, da die Stimulierbarkeit des Testsystems bei relativ hohen Schwankungen nur sehr gering ist und somit eine detaillierte Aussage zweifelhaft wäre. Dennoch ist aus der Zusammenstellung ersichtlich, daß die im Diaphragma aktivste Liposomenfraktion auch im epididymalen Fettgewebe zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führt. Die in vitro gefundene Aktivität [11] (25% der maximalen Insulinwirkung) kann also auch hier weitgehend bestätigt werden.

D. Wirkung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 auf die Glucoseaufnahme im Diaphragma und im Nebenhodenfettkörper der Maus.

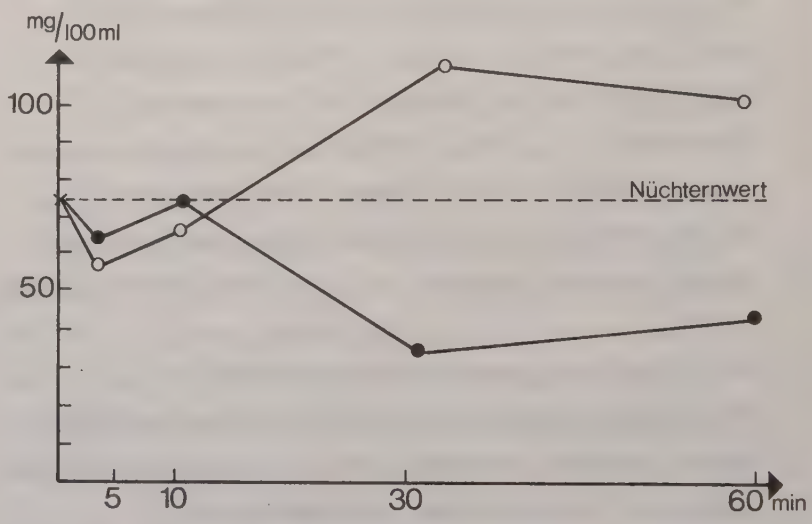
Das Oligopeptid Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 war auf Grund seiner Bedeutung in der Insulin B-Kette und seiner schon in vitro und in vivo aufgezeigten insulinähnlichen Aktivität von besonderen Interesse. Jedoch war nach intraperitonealer Injektion keine signifikante Blutzuckersenkung zu beobachten. Vielmehr konnte hier innerhalb der 1. Stunde eine erhebliche Blutzuckersteigerung

beobachtet werden. (Abbildung (2)) Bei intravenöser Injektion (Schwanzvene der Maus) erwies sich eine Dosis von mehr als 12,5 µM / Maus als toxisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle (9) dargestellt.
Die Werte " 2 - 3 min " bedeuten, daß die Blutzuckerwerte in der 2. und 3. Minute in verschiedenen Testreihen derart unterschiedlich waren, daß von einem Sprung innerhalb dieser Zeit gesprochen werden konnte.

Weiterhin wurde in einem Übersichtsversuch die in vivo Abbaugeschwindigkeit des Peptids bestimmt und festgestellt, daß sie wesentlich höher sein muß als die vergleichbare in vitro Abbaugeschwindigkeit.
Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, daß intraperitoneal verabreichtes Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 wohl zum größten Teil in der Leber abgefangen wird. Zudem kann das freie Peptid im Blut möglicherweise unspezifische Stoffwechseleffekte hervorrufen. Das als Liposom verkapselte Peptid bietet nun eventuell einen Schutz gegen Abbau oder unspezifische Wechselwirkung mit Bestandteilen des Blutes sowie die Möglichkeit, unter Umgehung der Leber peripheres Gewebe zu erreichen.

Das Oligopeptid wurde, wie beschrieben, in zwei in ihrer Lipidzusammensetzung unterschiedlichen Liposomen verkapselt. Als weitere Variante wurde hier ein

Abbildung 2



Wirkung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 o und Rinderinsulin ● auf de
Blutglucosespiegel bei Mäusen nach i.p. Injektion.
[c] Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 : 6 mg/Maus, [c] Insulin : 2 µg/Maus.
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.

Wirkung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 auf den Blutglucosespiegel bei Mäusen nach i.v. Injektion.

Zeit	1 min	2-3 min	4 min	20 min
mg/100ml	121,4 (4)	111,1 (9) 69,9 (9)	115,8 (4)	147,6 (4)

in % des Nüchternwertes.
[c] Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 : 3 mg/Maus
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Tabelle 9

Langzeitversuch unternommen. In Tabelle (10) sind die Ergebnisse der Versuche im Diaphragma wiedergegeben. Es zeigte sich, daß die verkapselte Substanz schon bei solchen Konzentrationen Aktivität aufweist, bei denen die freie Form noch völlig inaktiv ist.

Bemerkenswert ist ebenfalls die Langzeitwirkung der Liposomen, da noch nach 4 Stunden die gesamte Aktivität aufzufinden ist. Die statistisch weniger signifikanten Werte nach 24 Stunden deuten eine eventuelle Stoffwechselaktivität auch schon der leeren Liposomen an.
Die in vitro sehr geringe Aktivität des Oligopeptids in isolierten Fettzellen [14] konnte, wohl auch schon aus genannten Gründen, in diesem Testsystem nicht bestätigt werden.

E. Blutzuckerbestimmungen

Die Ergebnisse der Blutzuckerbestimmungen sind in den Tabellen (11) und (12) wiedergegeben.
Sämtliche Bestimmungen wurden nach der GOD-Perid-Methode (Boehringer, Mannheim) durchgeführt.
Bei der Interpretation der Ergenisse müssen folgende Überlegungen mit in Betracht gezogen werden : eine Blutzuckersenkung durch Insulin ist das Endergebnis einer

Wirkung von Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 in freier und verkapselter Form auf die Glucoseaufnahme im Mäusediaphragma

Zeit	Substanz	[c] Peptid	n	cpm/g	s	p
1 h	Liposomen PC/CH	0,77 µ M	18	6066	2173	<0,001 1
	Liposomen PC/CH		8	2860	441	
	Liposomen PC/CH/PI		22	2977	969	
	Liposomen PC/CH/PI	2,0 µ M	5	8645	3641	<0,001 1
	Leerwert		6	2623	412	
	Oligopeptid	9,3 µ M	6	11146	2814	<0,001 2
	Oligopeptid	0,77 µ M	4	3212	531	
4 h	Liposomen PC/CH/PI		5	2995	851	
	Liposomen PC/CH/PI	2,0 µ M	5	9768	1353	<0,001 1
	Oligopeptid	9,3 µ M	5	2477	1359	
	Leerwert		5	3318	696	
24 h	Liposomen PC/CH/PI		5	2369	872	<0,025 2
	Liposomen PC/CH/PI	2,0 µ M	5	3956	2319	<0,025 2
	Leerwert		4	965	425	
	Insulin 2,0 ug		5	1749	240	

1) gegenüber den entsprechenden Leeren Liposomen
2) gegenüber den entsprechenden Leerwerten

Abk. s. Tab. (1)

Tabelle 10

Reihe bekannter Wirkungen auf Transportvorgänge an der Plasmamembran, sowie auf den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Die hier bisher untersuchten insulinähnlichen Effekte beziehen sich lediglich auf die Glucoseaufnahme im intraperitonealen Raum. Die Änderung der Blutzuckerwerte stellt nun aber das Zusammenwirken aller Stoffwechseleffekte am Gesamtorganismus dar. Somit beschränken sich die Versuche auf die Beantwortung der Frage, in welchem Maße der am Diaphragma gefundene Effekt stark genug ist, um sich auch am Gesamtorganismus bemerkbar zu machen. Andere Stoffwechseleffekte bzw. gegenregulatorische Maßnahmen müssen aus dieser Betrachtungsweise herausfallen.

Weiterhin ist bis heute trotz beträchtlicher Bemühungen nicht restlos aufgeklärt, wo und in welcher Weise Liposomen bestimmter Größe und Lipidzusammensetzung von den Geweben aufgenommen werden. Eine besondere Rolle spielen auch weiterhin die Wechselwirkungen der Liposomen mit Bestandteilen des Blutes. Auch ist wenig bekannt darüber, welche Stoffwechseleffekte Liposomen selbst auszulösen vermögen. So wurde auf die Wirkung des Stearylamins schon hingewiesen.

Unter diesen Gesichtspunkten muß festgestellt werden, daß keine der verkapselten Substanzen den Blutzucker unter den gegebenen Bedingungen senkt.

Tabelle 11

Wirkung verkapselter Substanzen und Liposomen auf den Blutglucosespiegel bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion. t = 1 h

Liposomen			Verkapselte Substanz		
Lipidzusammensetzung [c] = 16,6 mg/Maus	n	% des Nüchtern-wertes	Substanz [c]	n	% des Nüchtern-wertes
PC_r/CH	15	111,84	Arginindiäthylamid (3,3 µM)	7	112,0
			Arginindiäthylamid (1,0 µM)	13	120,6
PC/CH	11	117,64	Arginindiäthylamid (0,6 µM)	8	99,7
			Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 (0,77 µM)	8	128,4
DPC/CH/ST	8	99,1	Agmatin (4 µM) beschallt	6	92,5
			Agmatin (8 µM) unbesch.	7	89,7
PC/CH/ST	5	131,6	Agmatin (4 µM) beschallt	7	116,5

Abk. s. Tab. (1

Wirkungen von PC/CH/PI - Liposomen und in diesen Liposomen verkapseltem Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 auf den Blutglucosespiegel bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion.

Substanz	Zeit					
	Werte in % des Nüchternwertes. In Klammern die Anzahl der Versuche					
	10 min.	30 min.	1 h	1,5 h	2,5 h	4 h
Leere Liposomen PC/CH/PI [c]= 16,6 mg/Maus	110 (6)	126,4 (7)	110,5 (9)	92,1 (5)	98,3 (3)	99,4 (5)
		92,1 (7)	69,5 (7)	67,4 (7)	69,9 (11)	66,3 (5)
In o.g. Liposomen verkapseltes Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 [c]= 2,0 µM			81,3 (5)		73,2 (4)	74,4 (5)

Tabelle 12

Die Liposomen selbst üben einen Einfluß auf den Glucosespiegel des Blutes aus. Die aus nur Lecithin und Cholesterin bestehenden Liposomen erhöhen den Blutzucker ein wenig. Bei der Zugabe von Phosphatidylinositol (PI) werden die Blutzuckerwerte entweder auf die Nüchternwerte reduziert oder, in der Mehrzahl der Fälle, auf unter 70 % der vergleichbaren Nüchternwerte gesenkt. Dabei wurde eine Grenze von tatsächlich 60 mg / 100 ml bis auf eine Ausnahme nicht unterschritten. Diese Aufsplitterung in zwei doch verschieden starke Stoffwechseleffekte mag dadurch zustande kommen, daß eine genaue Standardisierung in der Liposomenherstellung bisher kaum möglich ist.

Zudem mag die jeweilige Stoffwechsellage der verwendeten Mäuse eine Rolle spielen. Wenngleich darauf geachtet wurde, daß die Mäuse in etwa gleiches Gewicht hatten und auch die Zeit des " Nüchternsitzen " konstant war, so schwankte doch z.B. der Nüchternwert des Glucosespiegels im Serum von einer Versuchsreihe zur anderen zwischen 70 und 90 mg / 100 ml.

Die überraschenden Befunde bei der Blutzuckerbestimmung ließen es ratsam erscheinen, die Wirkung der Liposomen auch in vitro, unter genau definierten Bedingungen, zu untersuchen. Besondere Beachtung sollte hierbei das Phosphatidylinositol finden.

F. In vitro Verhalten von Liposomen und Phosphatidylinositol-Vesikeln.

1. Wirkung auf die [1-^{14}C] -Glucose-Oxidation an isolierten Fettzellen der Ratte.

Die in Tabelle (13) zusammengefaßten Ergebnisse demonstrieren zunächst in sehr deutlicher Weise, in wie weit in vivo und in vitro Aussagen differieren können; das vermehrte Lipidangebot hat die im Lipidstoffwechsel sehr aktiven Fettzellen nur in vitro zu sehr hoher Aktivität veranlaßt. Dieser Befund ist wohl auf eine in vivo verminderte Aufnahmebereitschaft der Lipide durch das Fettgewebe zurückzuführen. Eventuell könnte auch das dem Versuchsansatz zugesetzte Albumin eine entscheidende Rolle spielen.
Der Test hat sich bei Verwendung von Liposomen als Substrat als in dieser Form nicht brauchbar erwiesen. Dennoch bleibt auch wiederum ein deutlicher Hinweis auf die besondere Rolle des Phosphatidylinositols im Glucosestoffwechsel zurück. Da reines P.I. schon eine deutliche Aktivitätssteigerung aufweist, scheint die Aktivitätsminderung durch die Lecithin - Cholesterin-Phosphatidylinositol - Liposomen gegenüber den anderen Liposomen nicht unbedingt eine logische Konsequenz zu sein; es sei denn, man schreibt dem Phosphatidylinositol

Bildung von $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C]-Glucose in isolierten Fettzellen des Nebenhodenfettkörpers der Ratte unter dem Einfluß verschiedener Liposomen.
Versuchsanordnung s. Kap. II. B. 3.

Substanz	[c] µM/ml	n	Mittelwert in % des Insulinwertes	s
Liposomen PC/CH/PI	0,96 ± 0,07	12	39,8	6,7
Liposomen PC/CH	1,04	11	84,4	10,8
Phosphatidyl-inositol-Vesikel	1,16	5	8,3	1,4

Da die Stimulierbarkeit der Zellen in verschiedenen Versuchsreihen unterschiedlich war, wurden die Ergebnisse auf den Leerwert = 0% und den Insulinwert = 100% bezogen

Abk. s. Tab. (1)

Tabelle 13

eine eher regulierende Aufgabe zu.
Allerdings sind wegen fehlender Relevanz von in vitro und in vivo Werten weitere Untersuchungen in einem geänderten Testsystem notwendig.

2. Wirkung auf die [U-^{14}C] -Glucose-Aufnahme am isolierten Hemidiaphragma der Ratte.

Es wurden Dosis - Wirkungs - Tabellen aufgestellt für Rinderinsulin und für Phosphatidylcholin - Cholesterin - Phosphatidylinositol - Liposomen. (PH/CH/PI - Liposomen). Zudem wurden Phosphatidylcholin - Cholesterin - Liposomen (PC/CH - Liposomen) getestet, wie auch reine Phophatidylinositol - Vesikel.

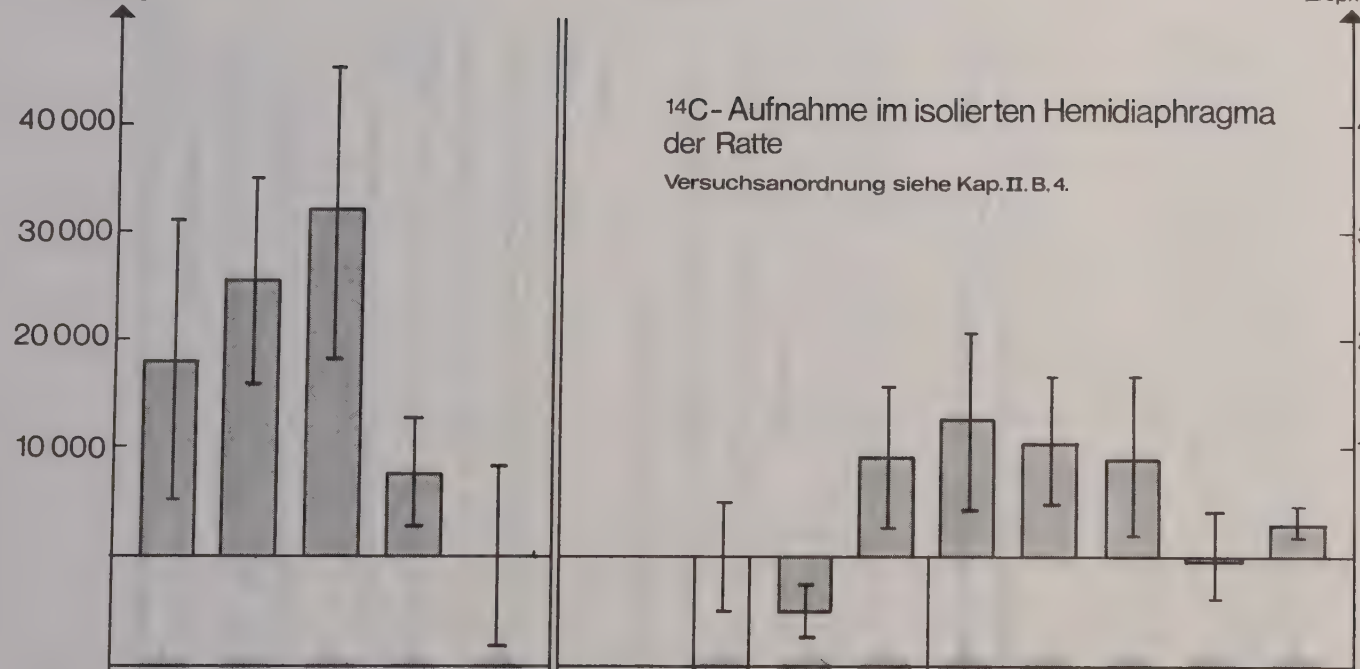
Aus Abbildung (3) ist ersichtlich, daß das Wirkungsmaximum von Rinderinsulin bei einer Konzentration von ungefähr 10 mIU / ml liegt. Dieser Befund ist im Einklang mit denen in der Literatur beschriebenen Versuchen mit Rinderinsulin am isolierten Diaphragma [37].

Weiterhin wurde gefunden, daß PC/CH - Liposomen die Aufnahme von ^{14}C - markierter Glucose auch in hoher Konzentration nicht stimulieren. Übersichtsversuche bei geringeren Konzentrationen der Liposomen erbrachten

Abbildung 3

^{14}C- Aufnahme im isolierten Hemidiaphragma der Ratte

Versuchsanordnung siehe Kap. II. B. 4.



IU/ml	0,2	0,1	0,01	0,001	0,0001
n	5	6	11	5	5

Insulin

[CI Lipid mg/ml	2,25	—	—	2,25	1,125	0,56	0,22	0,11
davon PI µM/ml	—	0,15	0,3	0,3	0,15	0,075	0,03	0,015
n	7	5	4	15	11	9	8	5
P	—	—	<0,05	<0,005	<0,005	<0,025	—	—

PC/CH-Lipos. | PI-Vesikel | PC/CH/PI-Liposomen

ebenfalls keine Aktivitätssteigerung. Hingegen steigern reine PI - Vesikel bei einer Konzentration von 0,3 µM / ml die Glucoseaufnahme auf ungefähr 26 % der maximalen Insulinwirkung.

Dieser Effekt wird noch gesteigert sobald Phosphatidylinositol als Liposom wirken kann. Hier wird schon bei einer Konzentration von nur 0,075 µM / ml eine erhebliche Stimulierung erreicht, die sich durch Dosiserhöhung nur noch wenig steigern läßt.

Die Ergebnisse sind trotz relativ hoher Standardabweichung signifikant und untermauern das unterschiedliche Verhalten der Liposomen im Blutzuckertest. Einerseits zeigt sich hier, daß Phosphatidylinositol in irgendeiner Weise auf Transportvorgänge durch die Plasmamembran Einfluß nimmt, andererseits scheinen Liposomen eine verstärkende Wirkung, durch erleichterte Fusion mit der Zelle oder bessere Phagozytose, zu besitzen.

IV. DISKUSSION

Der erfolgreiche Einsatz von Liposomen als carrier von Enzymen und pharmakologisch wirksamen Substanzen ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden [17]. Auf Grund dieser Untersuchungen erschien es sinnvoll, diese Methode auf Substanzen anzuwenden, deren insulinähnliche Aktivität in vitro erwiesen, in vivo aber nicht bzw. nur eingeschränkt bestätigt werden konnte.

Verkapselung und Wirkung im Diaphragma und Nebenhodenfettgewebe der Maus.

Die Verkapselung der drei Verbindungen Argininidiäthylamid, Agmatin und Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 erbrachte, z.T. innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite, recht gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Verkapselungsrate könnte bei Optimierung des Systems sicherlich noch erhöht werden. Diskussionspunkte sind vor allem Parameter, die hier konstant gehalten wurden : Die Konzentration der eingesetzten Substanzmenge, Beschallzeit und das molare Verhältnis der einzelnen Lipide untereinander.

Ein wesentliches Interesse der Arbeit aber lag auf der Wirkung verschiedener Liposomen und der in ihnen

verkapselten Substanzen im biologischen Test.
Die von Weitzel [8-13] gefundene in vitro Aktivität der drei untersuchten Verbindungen konnte in vivo mit Hilfe von Liposomen als carrier im Diaphragma der Maus bestätigt werden. Auch konnte gezeigt werden, daß verkapseltes Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 im gleichen System schon bei solchen Konzentrationen Wirkung zeigt, bei denen das unverkapselte Oligopeptid noch wirkungslos ist. Gleichzeitig konnte eine bemerkenswerte Langzeitwirkung beobachtet werden.
Diese Befunde unterstreichen zunächst die Nützlichkeit der Verwendung von Liposomen, darüber hinaus bestätigen sie aber auch die Aussagekraft des in vitro benutzten Systems.
Die Ergebnisse am Nebenhodenfett der Maus ergaben für verkapseltes Arginindiäthylamid noch eindeutige Werte, ansonsten war die Stimulierbarkeit des Gewebes zu schwach, um eindeutige Aussagen machen zu können.

Blutzuckerbestimmung und Wirkung auf periphere Gewebe.

Die Hoffnung, daß sich die erwiesenen lokalen Effekte mit Hilfe von Liposomen auch auf den Gesamtorganismus in Form einer Blutzuckersenkung ausweiten lassen, haben sich nicht erfüllt. Um die Ursachen zu erforschen

mußte zunächst sichergestellt sein, daß die verwendeten Liposomen auch periphere Gewebe erreichen können und nicht in der Leber oder der Milz abgefangen werden [44, 45]. Um zu einer eindeutigen Aussage zu kommen, wäre es notwendig gewesen, mit doppelt radioaktiv markierten Liposomen zu arbeiten. Weniger aufwendig und für die vorliegende Fragestellung aussagekräftig genug aber erschien die Verkapselung von Rinderinsulin zu sein, das dann ebenfalls in einer verkapselten Konzentration von etwa 3 µg / Maus intraperitoneal injiziert werden sollte. In dem hier nicht beschriebenen Übersichtsversuch, der analog den anderen Versuchen durchgeführt wurde, ergaben sich bei insgesamt 4 verschiedenen Präparationen folgende Ergebnisse :

	Lipidzusammensetzung	n	Zeit	Blutglucose in % des Leerwertes
1	PC/CH	4	1 h	112,2
2	PC/CH	4	1 h	105,8
3	PC/CH	3	1 h	54,5
4	PC/CH	3	1 h	67,0

In allen Fällen entsprachen dabei die Werte im Diaphragma denen von unverkapseltem Insulin.
Die Ergebnisse lassen stark darauf schließen, daß die hier verwendeten Liposomen nicht dazu geeignet sind, als carrier bei Untersuchungen insulinähnlicher Aktivitäten am Gesamtorganismus zu dienen.

Eine wesentliche Aktivitätsminderung von verkapseltem Insulin, das intraperitoneal verabreicht wurde, ergaben auch Untersuchungen von Dapergolas und Gregoriadis [40], allerdings an diabetischen Ratten. Bei ihnen führte die Injektion von 1 IU verkapselten Insulins / 100g Körpergewicht zu einer Blutzuckersenkung von 62% gegenüber der des freien Insulins von 33%. Da die Insulinkonzentration im hier benutzten System wesentlich geringer ist, ungefähr 230 mIU / 100g Körpergewicht, so ist es nicht verwunderlich, daß damit eine kritische Grenzkonzentration unterschritten wird, bei der lokale Effekte zu erzielen sind, die Wirkung auf den Gesamtorganismus aber ausbleiben kann. Es ist demnach nicht damit zu rechnen, daß sich die ohnehin schon geringere lokale Wirkung der untersuchten Verbindungen auf den Gesamtorganismus erstrecken können.
Weitere Untersuchungen in dieser Richtung erscheinen somit nur dann sinnvoll zu sein, wenn es gelingt,

die Liposomenstruktur so zu ändern, daß unter weitgehender Umgehung der Leber andere Gewebe erreicht werden können.

Stoffwechseleffekte leerer Liposomen und Phosphatidylinositol-Effekt.

Die Ergebnisse der Blutzuckeruntersuchungen haben einen deutlichen Hinweis darauf gegeben, daß Liposomen selbst Stoffwechseleffekte ausüben können. Besondere Vorsicht ist, wie beschrieben, bei Verwendung von künstlichen Zusätzen wie Stearylamin geboten. Doch auch bei Verwendung von nur natürlichen Lipiden sind Stoffwechseleffekte sicherlich nicht durch "vermehrte Verfütterung" von Cholesterin und Phospholipiden zu erklären. So führt die Fusion der Liposomen mit der Zelle zu einer veränderten Zusammensetzung der Membranlipide. Damit sind gegebenenfalls Änderungen in den Permeabilitätseigenschaften, im Transportsystem oder bei anderen biologischen Funktionen zu erwarten [43, 46]. Schon lange bekannt sind Zusammenhänge zwischen der Konzentration von Phospholipiden im Serum und der Atherosklerose [47, 48], weiterhin wird eine Wirkung von Phosphatidylcholin (EPL) auf die Aktivität verschiedener Lipasen diskutiert [49]. Bruni et al. [43]

beschreibt, daß eine beschallte Suspension von Phosphatidylserin aus Rinderhirn den Blutzucker bei Mäusen erhöht, Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol aus Rinderhirn aber keine Wirkung zeigen.

Die hier benutzten Präparationen, Phosphatidylcholin aus Ei, zeigten eine leichte Erhöhung der Blutzuckerwerte, Phosphatidylinositol aus Sojabohnen dagegen keine oder eine blutzuckersenkende Wirkung. Dieses Ergebnis war insofern überraschend als die leeren Liposomen (PC/CH/PI) am Diaphragma der Maus eine entsprechend deutliche Aktivität nicht aufzuweisen hatten. Diese momentan nicht zu interpretierenden Ergebnisse waren Veranlassung, das Verhalten von Liposomen und von Phosphatidylinositol-Vesikeln in zwei verschiedenen in vitro Systemen zu untersuchen.

Bei der Untersuchung der Glucoseoxidation in isolierten Fettzellen erwies sich der benutzte Test für die vorliegende Fragestellung als wenig tauglich. Die hohe Oxidationsrate von PC/CH - Liposomen zeigte an, daß wahrscheinlich nicht liposomenspezifische Eigenschaften, sondern andere, hier nicht weiter untersuchte Parameter, für die hohen Werte verantwortlich sind.
Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen bleibt den-

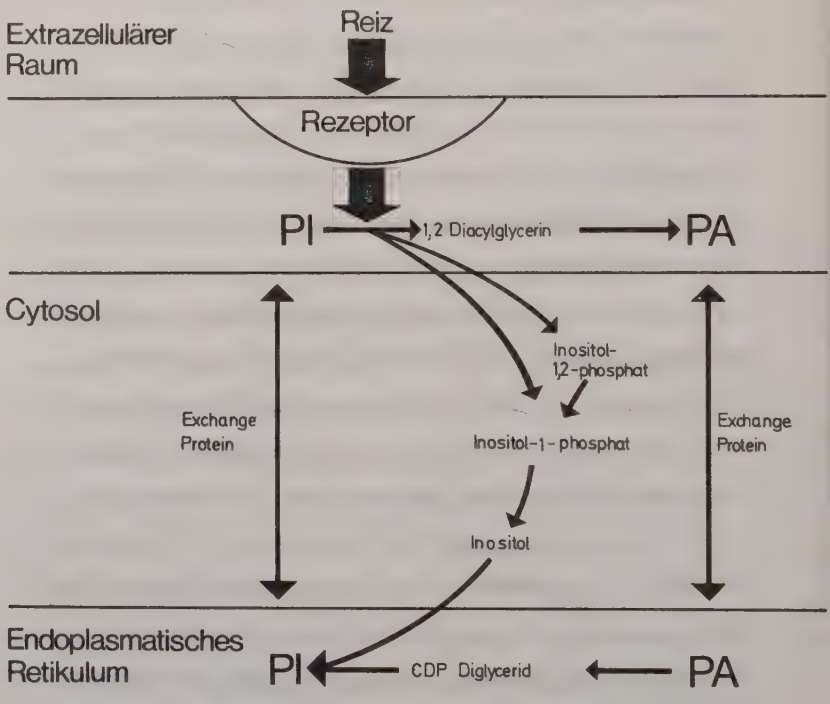
noch durch die in diesem System hemmende Wirkung der PC/CH/PI - Liposomen ein deutlicher Hinweis auf eine eventuelle Einwirkung von Phosphatidylinositol an Transportvorgängen durch die Zellmembran bestehen. Eine weitere Interpretation ist erst nach Erarbeitung eines adäquaten Systems möglich.

Am Diaphragma der Ratte konnte gezeigt werden, daß Phosphatidylinositol den Glucosetransport in die Zelle stimuliert. Dieser Effekt wird erheblich verstärkt, wenn Phosphatidylinositol als PC/CH/PI - Liposom vorliegt. Eine maximale Stimulierung scheint bei einer Konzentration von 0,15 - 0,3 µMol / ml zu liegen. Bemerkenswerterweise liegt diese Konzentration in der Größenordnung, in der Phosphatidylinositol im allgemeinen im Gewebe vorliegt [50]. (0,07 - 0,28 µMol / mg).
Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der schon erkannten, besonderen Bedeutung des Phosphatidylinositols bei der Vermittlung extrazellulärer Reize durch die Plasmamembran [51 - 54].

Eine Reihe von Transport- und Sekretionsprozessen ist mit einem gesteigerten turnover des Phosphatidylinositols verbunden [55, 56]. Der entscheidende 1. Schritt scheint dabei die Spaltung des Phospho-

lipids zu sein, wodurch durch eine noch nicht bekannte Weise der extrazelluläre Reiz in die Zelle weitergeleitet wird [51, 57]. (Abbildung 4)
Es wird allerdings die Bildung eines cyclischen Inosit-1,2-phosphat diskutiert, wobei die an cyclisches AMP erinnernde Reaktionsfolge nicht bewiesen ist. De Torrentegui und Berthet [58] konnten zeigen, daß die Wirkung von Insulin im Fettgewebe mit einem gesteigerten Phosphatidyl-turnover verbunden ist. Entsprechende Untersuchungen am Diaphragma sind in der Literatur nicht beschrieben, doch lassen die hier gefundenen Ergebnisse eine ähnliche Kopplung vermuten. Eine mögliche Erklärung der aufgezeigten Befunde wäre folgende :

Die durch Liposomenbildung erleichterte Fusion von Phosphatidylinositol mit der Zelle führt in der äußeren Zellmembran zu einer Erhöhung der Konzentration von Phosphatidylinositol, was eine Spaltung des Phospholipids mit entsprechender Zellantwort zur Folge hat.
Es ist nicht zu erwarten, daß, selbst bei Bestätigung dieser These, die erhaltenen Blutzuckerwerte aus einer Wirkung der PC/CH/PI - Liposomen am peripheren Gewebe resultieren. Hölzl [59] zeigte auf, daß nicht nur Phosphatidylcholin sondern auch



Vorstellung über einen Phosphatidylinositol-turnover als Antwort auf einen extrazellulären Reiz (nach Michell [51])

PI = Phosphatidylinositol, PA = Phosphatidsäure

Abbildung 4

Phosphatidylinositol rasch von der Leber, der Milz und auch der Lunge aufgenommen wird. Es läßt sich demnach eine Wirkung von Phosphatidylinositol auch in Leberzellen vermuten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden folgende drei guanidinohaltigen Verbindungen in Liposomen verkapselt :

1. Agmatin
2. Arginindiäthylamid
3. Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2

Als Verkapselungstechnik erwies sich die in ihren Grundzügen eingeführte Methode von Bangham [25] (hand - shaken - Methode) als praktikabel, wobei gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Lipidzusammensetzung der Vesikel bestand in allen Fällen aus Phosphatidylcholin und Cholesterin. Zusätze von Dicetylphosphat und Phosphatidylinositol hatten keinen wesentlichen Einfluß auf die Verkapselungsrate, ein Zusatz von Stearylamin führte bei Agmatin und Arginindiäthylamid zu einem erheblichen Anstieg des verkapselten Volumens.

Die drei verkapselten Substanzen wurden insulinsensitiven Testen unterzogen. Dabei konnten die beiden in vitro aktiven, in vivo aber inaktiven Verbindungen Agmatin und Arginindiäthylamid im Zwerchfell der Maus in verkapselter Form ihre in vitro Aktivität auch in vivo bestätigen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Arg-Gly-Phe-Phe-NH_2 in verkapselter

Form schon bei solchen Konzentrationen eine deutliche biologische Wirkung zeigt, bei der das freie Tetrapeptid noch unwirksam ist.
Damit konnte die Tauglichkeit der Liposomen als carrier in diesem System unter Beweis gestellt werden.

Eine Blutzuckersenkung bei Mäusen durch eine der verkapselten Substanzen konnte nicht festgestellt werden.

Die bei der Liposomenherstellung verwendeten Lipide zeigten teilweise schon selbst als leere Liposomen Stoffwechseleffekte. Phosphatidylcholin-Cholesterin-Liposomen stimulieren in vivo geringfügig die Glucoseaufnahme des Zwerchfells der Maus, ebenfalls erhöhen sie geringfügig den Blutzucker bei Mäusen.
Phosphatidylcholin-Cholesterin-Phosphatidylinositol-Liposomen zeigen bei Mäusen entweder keine oder eine leicht blutzuckersenkende Wirkung.
Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Phosphatidylinositol die Glucoseaufnahme im isolierten Hemidiaphragma der Ratte stimuliert. Dieser Effekt wird noch dann gesteigert, wenn Phosphatidylinositol als Bestandteil von Phosphatidylcholin-Cholesterin-Liposomen wirken kann.
Diese Ergebnisse unterstreichen die besondere Bedeutung des Phosphatidylinositols bei Transportvorgängen durch die Plasmamembran.

VI. LITERATUR

1) Weitzel,G., Schaeg,W., Willms,B. und Boden,F. (1965) Ann. 698, 248 - 258

2) Weber,U., Schneider,F., Köhler,R. und Weitzel,G. (1967) Z. Physiol. Chem. 348, 1715 - 1717

3) Weber,U., Hörnle,S., Köhler,P., Nagelschneider,G. und Weitzel,G. (1968) Z. Physiol. Chem. 349, 521 - 541

4) Weitzel,G., Weber,U., Eisele,K., Zollner,H. und Martin,J. (1970) Z. Physiol. Chem. 351, 521 - 541

5) Weitzel,G., Weber,U., Martin,J. und Eisele,K. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1005 - 1013

6) Weitzel,G., Bauer,F.U., und Eisele,K. (1976) Z. Physiol. Chem. 357, 187 - 200

7) Weitzel,G., Bauer,F.U. und Rehe,A. (1977) 358, 1573 - 1582

8) Weitzel,G., Eisele,K., Guglielmi,H., Stock,W. und Renner,R. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1735 - 1738

9) Weitzel,G., Eisele,K., Schulz,V. und Stock,W. (1973) Z. Physiol. Chem. 354, 321 - 330

10) Weitzel,G., Eisele,K. und Stock,W. (1975) Z. Physiol. Chem. 356, 583 - 590

11) Weitzel,G., Renner,R. und Guglielmi,H. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1617 - 1630

12) Weitzel,G., Renner,R. und Guglielmi,H. (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 536 - 539

13) Weitzel,G., Stock,W. und Guglielmi,H. (1972) Z. Physiol. Chem. 353, 1661 - 1670

14) Schulz,V. (1972) Biochemische Diplomarbeit Universität Tübingen

15) Bangham,A.D., Hill,M.W. und Miller,N.G.A. Methods in Membrane Biology 1, 1 - 68 (1974) Plenum Press New-York - London Editor : Edward D. Korn

16) Gregoriadis,G., Leathwood,P.D. und Ryman,B.E. (1971) FEBS Lett. 14, 95 - 99

17) Ryman,B.E. (1975) "Use of Liposomes as carriers of drug and other cell modifying molecules" in : Proceedings of 6th Intern. Congress Pharmacology, Vol 5, Clinical Pharmacology (M.Mattila, ed) Pergamon Press

18) Tyrrell,D.A., Heath,T.D., Colley,C.M. und Ryman,B.E. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 259 - 302

19) Sarrazin,W. (1975) Biochemische Diplomarbeit Universität Tübingen

20) Boisonnas,R.A., Guttmann,St., Huguenin,R.E., Jaquenoud,P.A. und Sandrin,E. (1958) Helv. Chim. Acta 41, 1867 - 1882

21) Wünsch,E. und Wendelberger,G. (1967) Chem. Ber. 100, 160 - 173

22) Zervas,L., Winitz,M. und Greenstein,J.P. (1957) J. Org. Chemistry 22, 1515

23) Wagner,H., Hörhammer,L. und Wolff,P. (1964) Biochem. Zeitschrift 334, 175 - 184

24) Deamer,D.W. und Bangham,A.D. (1976) Biochim. Biophys. Acta 443, 629 - 634

25) Bangham,A.D., Standish,M.M. und Watkins,J.C. (1965) J. Mol. Biol. 13, 238

26) Hinkle,P.C., Kim,J.J. und Racker,E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1338 - 1339

27) Deamer,D.W., Hill,M.W. und Bangham,A.D. (1976) Biophys. J. 16, A 111

28) Batzri,S. und Korn,E.D. (1975) J. Cell. Biol. 66, 621 - 634

29) Chong,C.S. und Colbow,K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 260 - 282

30) Huang,C. (1969) Biochemistry 8, 344 - 352

31) Hauser,H. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1049

32) Scarpa,A. und de Gier,J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 241, 789 - 797

33) Bangham,A.D., de Gier,J. und Greville,G.D. (1967) Chem. Phys. Lipids 1, 225 - 246

34) Matheson,A.T. und Tattrie,B.L. (1972) Can. J. Biochem. 42, 95 - 98

35) de Gier,J., Mandersloot,J.G. und van Deenen,L.L.M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 150, 666 - 675

36) Rafaelsen,O.J., Lauris,V. und Renold,A.E. (1965) Diabetes 14, 19 - 27

37) Kipnis,D.M. und Cori,C.F. (1957)
J. Biol. Chem. 224, 681 - 686

38) Fulks,R.M., Li,J.B. und Goldberg,A.L. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 290 - 298

39) Bhattacharya,K.R., Datta,J. und Roy,D.K.
(1958) Arch. Biochem. 77, 297 - 299

40) Dapergolas,G. und Gregoriadis,G. (1976)
The Lancet, October 16, 824 - 827

41) Black,C.D.V. und Gregoriadis,G.
(1976) Biochem. Soc. Transact. 4, 253 - 256

42) Blok,M.C., van Deenen,L.L.M. und de Gier,J.
(1977) Biochim. Biophys. Acta 464, 509 - 518

43) Bruni A. (1976) Nature 260, 331 - 333

44) Gregoriadis,G. und Ryman,B.E. (1971)
Biochem. J. 124, 58 - 59

45) Gregoriadis,G. und Ryman,B.E.
(1972) Ew. J. Biochem. 24, 485 - 488

46) Wirtz,K., Geurts van Kessel,W., Kamp,H. und Demel,R.
(1976) Eur. J. Biochem. 61, 515 - 523

47) Samochowiec,L. (1976) in Phosphatidylcholine,
211 - 226, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
New-York, Editor H.Peeters

48) Beyers S.O. und Friedmann,M. (1960)
J. Lipid Res. 1, 343 - 348

49) Howard,A.N. und Patelski,J. (1976) in Phosphatidylcholine, 187 - 200, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York, Editor H.Peeters

50) Hauser,G. und Eichberg,J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 326, 201 - 209

51) Michell,R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81 - 147

52) Buckley,T.J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 498, 1 - 9

53) Clements,R.S. und Reynertson,R. (1977) Diabetes 26, 215 - 221

54) Scarnati,O.C. und Lapetina,E.G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 360, 298 - 305

55) Clements,R.S. und Rhoten,W.B. (1976) J. of Clin. Invest. 57, 684 - 691

56) Waku,K., Nakazawa,Y. und Mori,W. (1976) J. Biochem. 79, 407 - 411

57) Lapetina,E.G. und Michell,R.H. (1973) FEBS Lett. 31, 1 - 10

58) De Torrentegui,G. und Berthet,J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 116, 477 - 482

59) Hölzl,J. (1976) in Phosphatidylcholine, 66 - 97, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York, Editor H.Peeters

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren :

Biochemie : H. Guglielmi, W. Stoffel, U. Weber, G. Weitzel
U. Weser

Organische Chemie : E. Bayer, E. Müller, G. Opitz

Anorganische Chemie : W. Rüdorff, E. Stumpp

Physikalische Chemie : H. Mauser, G. Schmid

Mikrobiologie : H. Diekmann, H. Zähner

Mathematik : W. Schweizer

Physik : H. Krüger

Botanik : E. Bünning, H. Metzner

Zoologie : K. G. Grell

Anatomie : K. Mörike

LEBENSLAUF

Am 25. Oktober 1942 wurde ich als Sohn des Volkswirtes Albert Sarrazin und dessen Ehefrau Erika, geb. Westphal, in Hannover geboren.
Ich besuchte ab 1949 die Grundschulen in Bokeloh üb. Wunstorf / Hannover, Paderborn und Düsseldorf, anschließend das Rethel - Gymnasium in Düsseldorf, wo ich im Frühjahr 1964 das Abitur ablegte. Nach meiner Militärzeit begann ich im Sommersemester 1966 das Studium der Biochemie in Tübingen, wechselte im Sommersemester 1967 an die Universität Köln und setzte das Biochemiestudium im Sommersemester 1968 in Tübingen fort. In diesem Semester legte ich den 1. Teil, im März 1971 den 2. Teil des Vordiploms ab. Die Diplomhauptprüfung folgte im Sommer 1974.
Von Oktober 1974 bis September 1975 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel an meiner Diplomarbeit mit dem Thema : Synthesen von Insulinpartialsequenzen und einigen Varianten aus den Positionen B 20 - B 25.
Von November 1975 bis Januar 1978 arbeitete ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel im selben Institut an der vorliegenden Dissertation.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41 - 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41 - 42